

BEST AVAILABLE COPY

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 昭63-279798

⑬ Int.Cl.

C 12 P 19/32
//(C 12 P 19/32)
C 12 R 1:13)
(C 12 P 19/32
C 12 R 1:15)
(C 12 P 19/32
C 12 R 1:19)
(C 12 P 19/32
C 12 R 1:44)

識別記号

府内整理番号

Z-7236-4B

⑭ 公開 昭和63年(1988)11月16日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 S-アデノシルメチオニンの製造法

⑯ 特願 昭62-115661

⑰ 出願 昭62(1987)5月12日

⑱ 発明者 藤尾 達郎 神奈川県相模原市相模台6-29-1

⑲ 発明者 榎本 豊 千葉県流山市流山2013-203

⑳ 出願人 協和醣酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明細書

1. 発明の名称

S-アデノシルメチオニンの製造法

2. 特許請求の範囲

プレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属またはスタフィロコッカス属に属し、アデニン、ATP生成基質、リポース前駆体、およびメチオニンからS-アデノシルメチオニンを生成する能力を有する微生物の培養液、菌体、またはそれらの処理物とアデニン、ATP生成基質、リポース前駆体、およびメチオニンとを、水性溶液中で接触させることにより、該水性溶液中にS-アデノシルメチオニンを蓄積させ、これを採取することを特徴とするS-アデノシルメチオニンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

S-アデノシルメチオニン（以下SAMと略記する）は、生体内に広く分布しており生体内のメチ

ル化反応におけるメチル基供与体として重要な生理活性物質であり、近年認病治療や脳血管障害治療などにおける化学療法剤として期待されている物質である。

従来の技術

SAMを製造する方法としては、(1)酵母をメチオニン含有培地にて培養し、該酵母菌体中に蓄積したSAMを抽出精製する方法〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 229, 1037(1957)〕、(2)酵母法によりメチオニンおよびアデノシン5'-三リン酸（以下ATPと略記する）からSAMを製造する方法（特開昭55-81592）。(3)酵母法によりSAMを製造するに際し、ATPの代わりにアデノシン、アデノシン5'-一リン酸（以下AMPと略記する）、アデノシン5'-二リン酸（以下ADPと略記する）などのATP前駆体と該前駆体からATPを生成する能力を有する微生物もしくは酵素を併せて用いる方法（特開昭55-96099公報参照）などが知られている。

BEST AVAILABLE COPY

特開昭63-279798(2)

発明が解決しようとする問題点

従来知られている方法では、菌体内にSAMを蓄積する場合はSAM生成量が十分ではないほか、精製が必ずしも容易ではなく、一方酵素法では、高価なATPを原料とする必要があり、いずれにしても十分に経済的な方法とは言えない。また、ATP生成系と共に作用する反応系の場合はATPの代わりに用いるアデノシン、AMP、ADPなどのATP前駆体も高価であり十分に経済的とは言えず、またATP再生系として酵素や酵素活性を有する菌体を併用する必要があることから製造プロセスが複雑になるほか、やはり経済性の点でも十分とは言えない。

問題点を解決するための手段

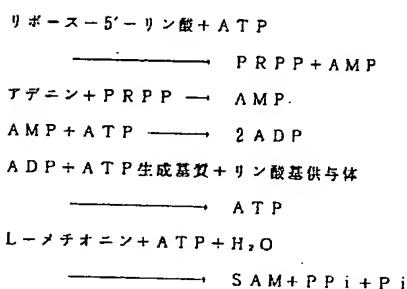
先に本発明者は、プレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属（特開昭59-51799公報参照）、およびエシェリヒア属、スタフィロコッカス属（特開昭60-210995公報参照）に属する微生物が、アデニン、ATP生成基質、リポース前駆体、およびリン酸基供与体から若葉のATPを生産する

ことを見いだした。ここでいうATP生成基質とは、ADPからATPを合成する際に必要なエネルギーを供給する物質を示している。該微生物はATP生成基質を活性化してATPを合成するために必要なエネルギーを獲得すると同時に、アデニンからAMPを生成するに要する5'-フヌスフォリボシル・ピロヌスフェート（以下PRPPと略記する）をリポース前駆体から合成することができる。このアデニンからATPを生成し得る能力（以下「ATP生成能」と略記することがある）と、これらの微生物が併せ持っているATPとメチオニンからSAMを合成する能力（以下「SAM生成能」と略記することがある）とを共役（下記式参照）させることによって、アデニン、メチオニン、ATP生成基質、およびリポース前駆体からSAMを製造できるプロセスを開発することに成功し、本発明を完成させるに至った。

リポース前駆体（グルコースなど）

リポース-5'-リン酸
(リポース生成系)

3



以下に本発明を詳細に説明する。

本発明は、ATPとメチオニンからSAMを生成し得る能力を有し、かつアデニン、ATP生成基質、リポース前駆体およびリン酸基供与体からATPを合成する能力を有する微生物の培養液、菌体、またはそれらの処理物の存在下、水性媒体中でアデニン、ATPの生成基質、リポース前駆体、リン酸基供与体およびメチオニンを接触させてSAMを生成させ、反応液からSAMを採取することを特徴とするSAMの製造方法を提供する。

本発明に用いる微生物としては、ATP生成能を有し、かつSAM生成能を有するものであれば

4

いずれでも使用できるが、例えばプレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、およびスタフィロコッカス属に属する下記の微生物を例示することができる。

プレビバクテリウム・アンモニア株	ATCC 21170
コリネバクテリウム・タムミクム	ATCC 21171
エシェリヒア・コリ C-600	ATCC 33525
エシェリヒア・コリ B	ATCC 11303
スタフィロコッカス・オーラクス	ATCC 4012

これらの微生物を通常の培養方法で培養することにより、アデニン、ATP生成基質、リポース前駆体、リン酸基供与体およびメチオニンからSAMを生成し得る活性を有する培養液、菌体を得ることができる。すなわち、これらの微生物を炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミン、ミネラル、核酸などを含有する通常の培地において、好気的条件下で温度、pHなどを調節しつつ培養を行えばよい。

炭素源としてはグルコース、フラクトース、シュークロース、マルトース、マンニトール、ソル

BEST AVAILABLE COPY

特開昭63-279798(3)

ビトールなどの炭水化物や糖アルコール、グリセロール、さらにビルピン酸、乳酸、クエン酸などの各種のアルコールや有機酸、グルタミン酸、メチオニン、リジンなどの各種アミノ酸などが使用できる。また、澱粉加水分解物、糊密、亜粘密、白糊、キャッサバ、バガス、コーン・スティーブ・リカーなどの天然有機炭素源も各微生物が変化できるものであればいずれでも用い得る。

窒素源としては、アンモニアあるいは塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種の無機および有機アンモニウム塩類、グルタミン酸、グルタミン、メチオニンなどのアミノ酸、あるいはペプトン、NZアミン、コーン・スティーブ・リカー、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物などの含窒素有機物などの種々の物が使用可能である。

さらに、無機物としては、リン酸二水素カリウム、リン酸一水素ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化鉄、硫酸

7

～8に調節しつつ、かつ20～50℃に1～48時間保ちつつ行わせる。アデニン、メチオニン、ATP生成基質、リポース前駆体およびリン酸基供与体の濃度は、いずれも1～100mg/mlの範囲にあることが望ましい。

アデニンとしては、精製品、粗精製品、アデニン発酵液の濃縮物、除菌体上清液およびその濃縮物など、アデニンからSAMへの反応を妨げないものであればいずれでも用いることができる。

メチオニンとしては、高度に精製された純品でも、粗精製品でも、またメチオニン含有量の多い天然物からの抽出物でも、SAM生成反応を妨げない物であればいずれでも使用できる。

ATP生成能およびSAM生成能を有する微生物の培養液もしくは固体の処理物としては、培養液および培養液を遠心分離して得られる上清液の濃縮物および乾燥物、遠心分離固体、凍結固体、さらには菌体の乾燥物、凍結乾燥物、アセトン処理物、界面活性剤および／または有機溶剤処理物、溶液酵素処理物、固定化菌体などがあげられる。

銅、塩化マンガン、モリブデン酸アンモニウム、硫酸亜鉛などを必要に応じて添加する。微生物の生育に必要なビタミン、アミノ酸、ミネラル、核酸その他のものは必要に応じて添加するが、前記したような他の培地成分に伴って培地に供給されれば特に加えなくてもよい。

培養は、振盪培養あるいは通気搅拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は20～50℃が良く、28～42℃がより好ましい。培養中の培地のpHは中性付近に維持することが望ましい。培養時間は通常1～72時間である。

接触は、微生物の培養中でもよく、培養後、培養液、菌体またはそれらの処理物とアデニン、ATP生成基質、リポース前駆体、リン酸基供与体およびメチオニンを水性溶媒中で接触させてもよい。

アデニンおよびメチオニンからSAMへの反応は、上記の接触時の混合液に、必要に応じてマグネシウムイオン、界面活性剤および／または有機溶剤などを加え、pHを6～10、より好ましくは7

8

また、該菌体から抽出したATPおよびSAM生成に関与する酵素、それらの酵素の精製標品、固定化物なども用いられる。

ATP生成基質およびリポース前駆体としては、使用する微生物によって利用され得るものであれば、グルコース、アラビノース、ラクトース、マルトース、ショウクロース、マンニトール、ソルビトール、トレハロース、糊密、亜粘密、その他の糖質、澱粉加水分解物などの炭水化物などいずれでも用いられる。ATP生成基質としては上記物質の他にビルピン酸、乳酸、酢酸、 α -ケトグルタル酸などの有機酸、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミンなどのアミノ酸などいずれでも用いられる。

リン酸基供与体としては、オルソリン酸、ピロリン酸、ボリリン酸、ポリメクリン酸、などの無機リン酸のナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩などいずれでも使用できる。その濃度は、10～100mMの範囲を保つことが望ましい。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・ス

テアリルアミン（例えばナイミーンS-215、日本油脂社製・以下界面活性剤いづれも日本油脂社製を用いる）、セチルトリメチルアンモニウム・プロマイド、カチオンFB、カチオンF、-40Eなどのカチオン性界面活性剤、ナトリウムオレイルアミド硫酸、ニューレックスTAB、ラビソール80などのアニオン系界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン・モノステアレード（例えばノニオンST221）などの両性界面活性剤、その他三級アミンPB、ヘキサデシルジメチルアミンなど、SAM生成反応を促進する物であればいずれでも使用でき、これらは通常0.1～50mg/ml、好ましくは1～20mg/mlの濃度にて用いられる。また、有機溶剤としては、トルエン、キシレン、脂肪族アルコール、ベンゼン、酢酸エチルなどが用いられ、その濃度は0.1～50μl/ml、好ましくは1～20μl/mlがよい。

反応液中のマグネシウムイオンの濃度は、4～400mg/mlの範囲を保つことが望ましい。培養液もしくは菌体などから反応系に持ち込まれる量がこの

特開昭63-279798(4)
濃度範囲を満たす場合は添加の必要はなく、一方、不足あるいは過剰となる場合は上記の濃度範囲に入るように調整する。マグネシウムイオンとしては無機塩でも、有機酸の塩でも使用できる。

反応液中に蓄積したSAMは、常法に従って処理することにより取得することができる。例えば、SAM含有液を強酸性のカチオン交換樹脂に吸着させ、硫酸にて溶出した液にリンタングステン酸を加えてSAMを沈殿させる方法によりSAMを得ることができる。なお、SAMの回収に際して硫酸、パラトルエンスルホン酸、スルホサリチル酸などの酸を用いて塩にすることにより安定化して収率よく回収することができる。

以下に、本発明の実施例を示す。

実施例1.

ブレビバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21170を、グルコース10mg/ml、ポリペプトン10mg/ml、肉エキス10mg/ml、酵母エキス5mg/ml、食塩3mg/ml(pH 7.2)からなる培地30mlを含む300ml容三角フラスコに、寒天25mg/mlを加えた

1 1

同組成の試験管斜面培地にて培養（植菌後30℃にて一晩静置）した菌から一白金耳植箇し、回転振盪後(150rpm)にて18時間振盪培養した。この種培養液を、グルコース150mg/ml、カゼイン加水分解物0.1mg/ml、酵母エキス7mg/ml、硫酸安10mg/ml、KH₂PO₄3mg/ml、K₂HPO₄3mg/ml、MgSO₄·7H₂O5mg/ml、アデニン、グアニン各10μg/ml、ピオチン10μg/mlの組成の培地をpH 7.2に調整後300ml容バッフル付き三角フラスコに20mlずつ分注し、120℃、20分間蒸気殺菌した培地に2ml植菌した。回転振盪培養にて30℃で培養中、必要に応じ尿素添加することによって、pHを中性付近に保った。

この培養終了液を集め、20mlずつ200ml容ビーカーに移し、アデニン5mg/ml、グルコース50mg/ml、Na₂PO₄5mg/ml、メチオニン10mg/mlを添加したもの(A)、(A)にさらに界面活性剤（ナイミーンS-215 5mg/ml）を添加したもの(B)、キシレン(10μl/ml)を添加したもの(C)、ナイミーンS-215(5mg/ml)およびキシレン

1 2

(10μl/ml)を両方同時に添加したもの(D)を、5規定の苛性ソーダでpH 7.3付近に保ちつつ、30℃にて18時間保った。なお、その間マグネティック・スターラーにて900rpmで攪拌を行った。結果を第1表に示す。

第 1 表

条件	SAM (mg/ml)
(A)	0.08
(B)	0.77
(C)	1.35
(D)	2.51

実施例2.

ブレビバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21170、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC21171、エシェリヒア・コリ C-600 ATCC 33525、エシェリヒア・コリ B ATCC 11303、スタフィロコッカス・オーレウス ATCC 4012を実施例1と同様に培養し、得られた培養液を用いて、実施例1の(D)と同一の反応条件で反応した結果を第

BEST AVAILABLE COPY

特開昭63-279798(5)

2表に示す。

第 2 表

菌 株		SAM(ng/ml)
ブレビパクテリウム・アンモニアゲネス	ATCC 21170	2.79
コリネパクテリウム・グルタミクム	ATCC 21171	1.65
エシェリヒア・コリ C-600	ATCC 33525	1.30
エシェリヒア・コリ 8	ATCC 11303	1.56
スタフィロコッカス・オーレкус	ATCC 4012	0.88

発明の効果

本発明により ATP生成能と SAM生成能を合わせ有する微生物を用いて、S-アデノシルメチオニンを安価に工業的に製造することができる。

特許出願人(102) 協和醣酵工業株式会社

代表者

加藤幹夫



THIS PAGE BLANK (USPTO)